

## Исследование продуктов ТЕМРО-окисления крахмала

Лукина Е.С.,\* Тимофеева Д.И., Понеделькина И.Ю.

Институт нефтехимии и катализа РАН, Проспект Октября, 141, г. Уфа. Факс 347 284 2750; тел 347 284 2750; E-mail: elenlykina@rambler.ru

Частично окисленные образцы крахмала получены окислением реагентом NaOCl-NaBr- 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМРО) и охарактеризованы методами ЯМР-спектроскопии и кислотно-основного титрования. Установлены моносахаридный состав и распределение триадных последовательностей AAA, GGG, GGA, AGG и AGA.

### Введение

В последние 15 лет окисление с использованием системы реагентов NaOCl-бромид и 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида (ТЕМРО) как катализатора стало одним из приоритетных и успешных методов получения полиуроновых кислот из крахмала, амилозы и амилопектина.<sup>1-5</sup> Продукты неполного окисления этих полисахаридов также представляют определенный интерес: с одной стороны, варьируя содержание функциональных групп различной природы, можно целенаправленно изменять физико-химические свойства полимеров, с другой стороны, анализ продуктов важен при обсуждении механизма ТЕМРО-окисления, который не считается до конца установленным.

### Результаты и обсуждение

В варьируемых условиях с помощью реагента NaOCl-ТЕМРО в присутствии NaBr (или без NaBr) в водной среде из водорастворимого крахмала **1** нами были получены полностью **7** и частично окисленные образцы **2-6** с различной степенью превращения звеньев глюкозы в звенья глюкуроната – натриевой соли GlcA (схема 1).

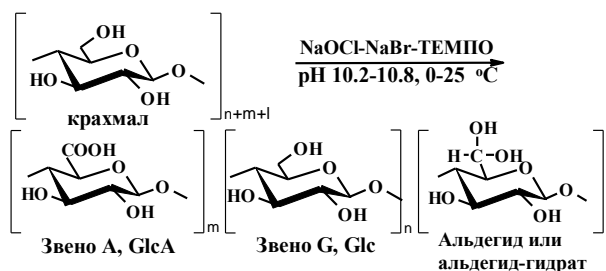


Схема 1. Окисление крахмала реагентом NaOCl-NaBr-ТЕМРО в водно-щелочной среде

В ИК-спектрах всех образцов соответствующий карбоксилатной группе пик был зарегистрирован при 1604 см<sup>-1</sup>. Содержание карбоксильных групп определяли путем кислотно-основного титрования после перевода образцов в H<sup>+</sup>-форму с помощью катионита Dowex 50. Полноту превращения глюкуроната в звенья GlcA контролировали по исчезновению пика при 1604 см<sup>-1</sup> и появлению пика при 1723 см<sup>-1</sup>, соответствующего свободной

карбоксильной группе. На основании результатов титрования была определена массовая доля GlcA и по формуле (1) рассчитано ее мольное содержание (т.е. количество остатков GlcA в расчете на 100 сахаридных звеньев цепи, % мольн.) (табл. 1).

$$\frac{N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 100}{[m - (N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 176)] / 162 + (N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}})} \quad (1)$$

где  $N_{\text{NaOH}}$  – титр NaOH,  $V_{\text{NaOH}}$  – объем щелочи, пошедшей на титрование образца окисленного крахмала (в H<sup>+</sup>-форме) массой  $m$ , 162 и 176 – молекулярные массы остатков Glc и GlcA соответственно.

По результатам титрования содержание звеньев GlcA в образцах **2-7** было рассчитано как 21, 32, 33, 42, 60% соответственно (табл. 1). Во всех случаях при проведении реакций окисления расход NaOH был значительно выше, чем это требуется по уравнению (1), и не соответствовал найденной нами степени окисления. Непроизводительный расход NaOH можно объяснить разложением водного раствора NaOCl, которое сопровождается понижением pH вследствие накопления HCl по реакции  $\text{OCl}^- + \text{HOCl} \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{Cl}^- + \text{H}^+$  или  $2\text{HOCl} \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{Cl}^-$ . Действительно, контрольный опыт в отсутствие ТЕМРО показал, что в реакции 1 ммоль крахмала с 2.2 ммоль NaOCl на поддержание pH среды израсходовалось 0.344 ммоль NaOH (15.6%). Очевидно, катализатором разложения NaOCl являлся крахмал или, возможно, содержащиеся в нем примеси; крахмал при этом остался неокисленным.

Все образцы **2-7** были исследованы методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии. Для сравнения были получены спектральные характеристики исходного крахмала **1** и чистого полиглюкуроната **7**.

Изменения, происходящие в крахмале в результате окисления, лучше всего наблюдались в протонных спектрах в области аномерных протонов (рис. 1, табл. 1). Как видно из <sup>1</sup>H ЯМР спектров крахмала **1** и полиглюкуроната **7**, аномерные протоны крахмала ( $\delta$  5.30 м.д.) и чистого

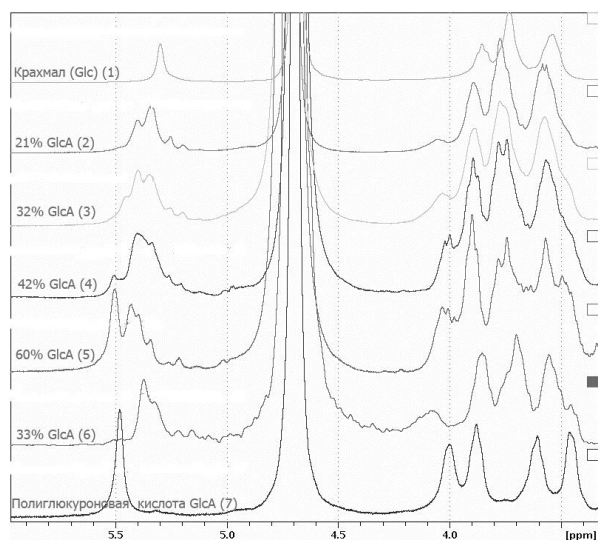


Рис. 1.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры образцов крахмала 1-7

полиглюкуроната ( $\delta$  5.53 м.д.) различаются по значению химсдвига на 0.23 м.д., и их относительная интенсивность могла бы быть полезной при расчете степени окисления крахмала (вместо кислотно-основного титрования, требующего большого количества образца и дополнительной процедуры получения его в  $\text{H}^+$ -форме). Однако в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах всех образцов частично окисленного крахмала в аномерной области наблюдалось от 4 до 6 сигналов, различных по химсдвигу и интенсивности, причем сигнал с  $\delta$  5.51-5.53 м.д., отвечающий аномерному протону GlcA, имел небольшую интенсивность или отсутствовал совсем (рис. 1), что указывало, согласно работе<sup>4</sup>, на минорное содержание остатка GlcA. Этот факт противоречил результатам кислотно-основного титрования и данным ИК-спектроскопии, поэтому мы предположили, что вероятнее всего положение сигналов C1-H протонов обоих моносахаридов – как Glc (далее они обозначены как **G**), так и GlcA (обозначены как **A**) – зависит от природы соседних остатков в триадах.

Следует отметить, что гемиацетали в структуре частично окисленных крахмалов 2-6 не были найдены: в спектрах COSY кросс-пик взаимодействия C6-H протона с C5-H протоном отсутствовал. Сигналы в области с  $\delta$  5.18-5.27 м.д., коррелирующие, соответственно, с сигналами  $\delta$  87.3-88.2 м.д. в спектрах HSQC, были отнесены к C6-H протонам альдегидных групп в гидратированной форме. Содержание гидрат-альдегидных звеньев было рассчитано из отношения интегральных интенсивностей сигналов с  $\delta$  5.18-5.27 м.д. и суммы всех сигналов в области  $\delta$  5.18-5.53 м.д. (100%) и варьировалось в образцах 2-6 от 7.9 до 17.9% (табл.1).

Анализ и обсуждение моносахаридного состава продуктов частично окисленного крахмала выполнены нами для образцов 5 и 6, содержащих, соответственно, 60 и 33% мольн. звеньев GlcA, ЯМР-спектры которых значительно различаются. Для сравнения в табл. 1 приведены все основные

сигналы в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах крахмала 1 и полиглюкуроната 7. При обсуждении принималось во внимание, что в продуктах окисления могут присутствовать все возможные последовательности моносахаридных звеньев: блоки ...AAA..., ...GGA..., ...AGG..., ...AGA... и ...GGG....

В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре образца 6 в аномерной области обнаруживаются три основных сигнала различной интенсивности, причем два терминальных сигнала (98.5 и 99.9 м.д.) по химсдвигу отличаются как от сигнала атома C1 в спектре полиглюкуроната (97.5 м.д.), так и от аналогичного сигнала крахмала (100.5 м.д.). Это свидетельствует о том, что в образце практически отсутствуют длинные последовательности, состоящие из остатков Glc (...GGG...) или GlcA (...AAA...). Это подтверждается и положением наиболее интенсивных сигналов аномерных протонов: 5.34 и 5.39 м.д.

Для атома C5 в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре образца 6 наблюдались 2 сигнала – с  $\delta$  71.6 и 70.4 м.д., отвечающие окисленному и неокисленному звеньям соответственно. Интересно отметить, что оба сигнала сдвигались в сильное поле по сравнению с аналогичными сигналами исходного крахмала 1 и полиглюкуроната 7. Это говорит о том, что вероятнее всего основная структура образца 6 может быть представлена двумя типами триад: **GGA** и **AGG**. В  $^1\text{H}$  ЯМР спектре сигнал H5 наблюдается в виде уширенного пика в области  $\delta$  4.11-4.17 м.д. и находится в более слабом поле, чем сигнал H5 в спектре полиглюкуроната 7 (3.99 м.д.).

Содержание звеньев GlcA (28.7%) в образце 6, найденное как разница между его общей степенью окисления (43%) и содержанием гидрат-альдегидных звеньев (14.7%), удовлетворительно совпадало с содержанием GlcA, найденным методом кислотно-основного титрования (33%) (табл.1).

В спектре  $^{13}\text{C}$  ЯМР для карбоксильной группы звена GlcA, для C6 гидроксиметильной группы звена Glc наблюдаются по два сигнала, что свидетельствует о влиянии соседних звеньев различной природы на положение химических сдвигов.

В отличие от образца 6, продукт 5 представлял собой полисахарид, содержащий, по-видимому, все возможные триады **AAA**, **GGA**, **AGG** и **AGA**, а также блоки **GGG** в минорном количестве. Аномерные атомы углерода для триад **AAA** и **GGG** в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре были найдены в области с  $\delta$  97.6 м.д. и 100.3 м.д. соответственно. Соответствующие атомы водорода в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре были представлены сигналами с  $\delta$  5.53 и 5.30 м.д. Остальные сигналы в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре и три наиболее интенсивных сигнала в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре (5.34, 5.39 и 5.43 м.д.) относились, очевидно, к оставшимся триадам. Новый сигнал с  $\delta$  5.43 м.д., отсутствовавший в образце 6, отвечал аномерному протону центрального звена GlcA в триаде **AGA** (табл.1).

Подтверждением существования в образце 5 триад **GGA**, **AGG** и **AGA** являлись три сигнала в  $^{13}\text{C}$

Табл. 1. Характеристика образцов частично окисленного крахмала

| № образца | Содержание звеньев GlcA (%), кислотно-основное титрование | Химсдвиги H-C6 в альдегид-гидратных звеньях и аномерных протонов H-C1, $\delta$ , м.д. | Содержание альдегид-гидратных звеньев, распределение последовательностей (%) | Общая степень окисления (%) |
|-----------|---|--|--|-----------------------------|
| 1         | 0   | 5.31   | 0  | 0                           |
|           |   | 5.20   | 6.6  |                             |
| 2         | 21  | 5.26   | 11.0   | 38.3                        |
|           |   | 5.34   | 48.0 – AGG   |                             |
|           |   | 5.40   | 34.4 – GGA   |                             |
| 3         | 42  | 5.26   | 9.8  | 41.8                        |
|           |   | 5.35   | 35.1 – AGG   |                             |
|           |   | 5.40   | 31.5 – GGA   |                             |
|           |   | 5.45   | 16.8 – AGA   |                             |
| 4         | 32  | 5.22   | 8.2  | 47.0                        |
|           |   | 5.27   | 9.7  |                             |
|           |   | 5.34   | 33.1 – AGG   |                             |
|           |   | 5.39   | 41.4 – GGA   |                             |
|           |   | 5.50   | 7.6 – AAA  |                             |
| 5         | 60  | 5.22   | 3.5  | 73.4                        |
|           |   | 5.27   | 4.4  |                             |
|           |   | 5.35   | 10.3 – AGG   |                             |
|           |   | 5.40   | 24.0 – GGA   |                             |
|           |   | 5.43   | 30.8 – AGA   |                             |
|           |   | 5.50   | 27.9 – AAA   |                             |
| 6         | 33  | 5.18   | 6.4  | 43.0                        |
|           |   | 5.24   | 8.3  |                             |
|           |   | 5.34   | 37 – AGG   |                             |
|           |   | 5.39   | 44 – GGA   |                             |
|           |   | 5.50   | 5 – AAA  |                             |
| 7         | 100   | 5.53   | 100 – AAA  | 100                         |

Общая степень окисления найдена из отношения интегральной интенсивности сигналов  $\delta$  3.99-4.17 м.д. H-C5 и суммарной интенсивности сигналов в области 5.20-5.53 м.д. H-C1

ЯМР спектре для атома C5 в неокисленном звене Glc – с  $\delta$  71.2 и 71.0 и 70.3 м.д., мультиплетная структура уширенного сигнала атома C4 (76.7-76.1 м.д.), а также три различающихся по химсдвигу сигнала для атома C6 гидроксиметильной группы Glc (60.4, 60.16 и 60.12 м.д.).

Как и для образца 6, в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре продукта 4 сигнал H5 для звена GlcA был представлен несколькими сигналами в области  $\delta$  3.98-4.04 м.д., однако все они были смещены в более сильное поле по сравнению с H5 в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре образца 6.

Как видно из рис.1 и табл. 1, структура образцов 2 и 4 отличается высоким содержанием гемиацеталей (17.6-17.9%) и представлена в основном двумя типами триад **AGG** и **GGA**, отличаясь от продукта 6 их содержанием. Продукт 3 содержит 9.8% гемиацеталей и 3 типа триад **GGA**, **AGG** и **AGA**, в чем похож на образец 5. При этом триады **AAA** в нем отсутствуют.

Таким образом, в зависимости от условий окисления нами были получены частично окисленные образцы крахмала, обнаружено влияние соседних звеньев на положение химсдвигов сигналов протонов и углеродов в спектрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР, с помощью ИК, ЯМР-спектроскопии и метода кислотно-основного титрования установлен моносакхаридный состав и распределение триадных последовательностей **AAA**, **GGG**, **GGA**, **AGG** и **AGA** в продуктах окисления.

## Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на приборах «Bruker Avance-400», рабочие частоты – 400.13 МГц ( $^1\text{H}$ ) и 100.62 (13C) МГц, растворитель – D<sub>2</sub>O. Гомо- и гетероядерные методики COSY, HSQC, HMBC соответствовали стандартным методикам фирмы «Bruker». Химические сдвиги приведены в  $\delta$ -шкале относительно натриевой соли 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоновой кислоты и ацетона как стандартов. ИК-спектры веществ снимали на спектрометре VERTEX 70v («Bruker») (на пластинках из CaF<sub>2</sub>). Для контроля pH растворов использовали pH-метр «pH-340». В работе применялись NaOCl (водный раствор) и ТЕМПО фирмы «Acros», NaBr (ч.д.а.). Молярную концентрацию раствора NaOCl определяли по интенсивности поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$  292 нм [19],  $\epsilon=350 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , кювета 1 мм).

**Общая методика реакции окисления крахмала.** Образцы 2-6 (натриевые соли). Растворяли в 27 мл воды 162 мг (1 ммоль) крахмала 1, нагревали до 95 оС, охлаждали до нужной температуры, и добавляли 1.7 мг (0.011 ммоль) ТЕМПО в 0.5 мл воды, при интенсивном перемешивании вносили 2-2.2 ммоль NaOCl. Сразу после этого к реакционной смеси добавляли 1 н. HCl до pH 10.2 или 10.8 и поддерживали эти значения титрованием 0.35 н. раствором NaOH. Реакцию останавливали в

определенный момент добавлением 2-3 мл этанола. Затем добавляли 80 мл (~3-кратный объем) охлажденного метанола, образовавшийся осадок центрифугировали, промывали последовательно метанолом (10 мл), диэтиловым эфиром (5 мл) и выдерживали 2 ч при пониженном давлении и температуре не выше 60°C. Получили 140-150 мг образцов **2-6** в виде белых, растворимых в воде порошков.

Полиглюкуронат **7** был получен аналогично образцам **2-6** с добавлением в реакционную смесь 40 мг (0.39 ммоль) NaBr.

**Определение содержания D-глюкуроновой кислоты** в образцах окисленного крахмала **2-7** методом кислотно-основного титрования. Каждый образец **2-7** (в виде натриевой соли) массой 50-60 мг растворяли в 3-5 мл воды, наносили на колонку (22×70 мм), заполненную катионитом Dowex 50WX4 (в H<sup>+</sup> форме), промывали водой. Собирали фракции элюатов с кислым pH, поглощающие при  $\lambda=220$  нм. Водный раствор каждого образца упаривали на ротонном испарителе и высушивали в

вакууме до постоянного веса. Затем каждый образец растворяли в 5 мл воды и титровали 0.09 н. NaOH, индикатор фенолфталеин.

### **Библиографический список**

- 1 G.S. Nilsson, K.E. Bergquist, U. Nilsson, L. Gorton // *Starch*. **1996**. V.48. С. 352-357.
- 2 F. Larsen, A. Blennow, S. Engelsen // *Food Biophysics*. **2008**. V 3. P. 25-32.
- 3 P.L. Bragda, H. Bekkumb, A.C. Besemer // *Topics in Catalysis*. **2004**. V.27. P 49-66.
- 4 Y. Kato, R. Matsuo, A. Isogai // *Carbohydrate Polymer*. **2003**. V.51. P.69-81.
- 5 A. Potthast, T. Rosenau, P. Kosma // *Adv Polym Sci* **2006**. V.205. P.1-48
- 6 R. Panikkar, D. Brasch // *Carbohydrate Research*. **1996**. V.293. P. 119-132.
- 7 H. Grasdalen, A. Andersen, B. Larsen // *Carbohydrate Research*. **1996**. V.289. P. 105-114.